

(6) 植種を伴う非滅菌高温L-乳酸発酵における 培養温度とpHの影響

赤尾 聡史^{1*}・津野 洋¹・堀江 匠¹

¹京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8530京都市西京区京都大学桂)

* E-mail: s.akao@i06.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

非滅菌の模擬生ごみを培地とし、植種として共生ごみからL-乳酸発酵を実施した発酵液を利用する、半連続式培養を意図した回分式培養により、培養温度とpHに関するL-乳酸発酵の実施可能条件の検討を行った。培養条件を、既往研究によりL-乳酸発酵を確認している55°CでpH5.5の条件から低温化および高pH化の方向に設定した結果、50°CでpH6.5の条件において43.4 g/L、光学純度99.3%のL-乳酸が得られた。また、各培養条件の結果から、培養温度とpHを説明変数とする重回帰式によりL-乳酸生成量を予測できることが示された。この重回帰式は、培養条件を高温L-乳酸発酵のL-乳酸菌*Bacillus coagulans*の増殖至適域である50°CでpH6.5付近に接近させることで、L-乳酸生成量が増加することを示すものであった。

Key Words : cultivation temperature, inoculation, L-lactate, pH, unsterilized garbage

1. はじめに

バイオマスである有機性廃棄物の資源化は、急騰する原油価格などのエネルギー事情を考慮すると、社会の持続的発展に欠かせない重要課題である。その資源化法としては、燃焼させ熱回収を行うことのほか、主に水分含量の多いものを対象としたコンポストやメタン発酵などが現在行われている。このような中で、都市廃棄物である生ごみをL-乳酸の原料として利用する試みも提案されている¹⁾。

L-乳酸は、近年生分解性プラスチックとして生産量が急増しているポリ乳酸 (PLA) の原料として利用できる。そのため、L-乳酸は非常に高い市場性を有している。L-乳酸はトウモロコシなど糖質含量の高い農作物を原料に発酵により生産されているが、農業廃棄物など代替物からの生産も盛んに研究されている²⁾。

L-乳酸を生成する菌 (以下、L-乳酸菌) について、工業的には*Rhizopus*属の利用が指摘されるものの、製造工程などは不明とされる³⁾。一方、研究の場では、*Lactobacillus*属や*Lactococcus*属などが利用される。一般的に、これらの乳酸菌を利用してL-乳酸発酵を行う場合、製造工程全体の滅菌に加えて、糖質原料を糖化 (加水分解) するための酵素添加、さらにL-乳酸菌の植種が行われる。この理由は、高い光学純度のL-乳酸を得るためには雑菌を排除する必要

があること、および、乳酸菌の直接の基質は単糖であるものの、それらのうち多糖を単糖まで加水分解する糖化酵素を誘導できる種は非常に限られていることによる。生ごみからPLA生産を行っている白井らのL-乳酸発酵法⁴⁾も、生ごみを破碎後、滅菌、酵素による糖化、L-乳酸菌*Lactobacillus rhamnosus*の植種を行っている。

このような一般的なL-乳酸発酵法に対して、製造コストの低減化を目的に滅菌操作を伴わない非滅菌環境で行う乳酸発酵の試みもいくつか報告されている。Sakai *et al.*⁵⁾は、非滅菌の模擬生ごみを間欠的にpH7とする37°Cの培養に供することで、模擬生ごみ中に存在する乳酸菌による乳酸発酵を実施した。しかし、その研究では*Lactobacillus plantarum*などのDL-乳酸菌の優占化が起こり、L-乳酸発酵とはなっていない。これに対して、Taniguchi *et al.*⁶⁾は、糖化处理した脱脂米糠に対して*L. rhamnosus*の植種を行い、pH4.5の低pH環境とすることで非滅菌環境でのL-乳酸発酵を実施した。さらに、Akao *et al.*⁶⁾は、非滅菌の模擬生ごみを原料とし、糖化处理および植種も行わず55°CでpH5.5の条件下で回分式培養を行うことにより、高温耐性を有する*Bacillus coagulans*の自然な優占化によるL-乳酸生成が起こることを示した。このL-乳酸発酵法は、糖化处理まで*B. coagulans*に担わせることが可能であり⁷⁾、Taniguchi *et al.*と比べて糖化处理を省ける点から、製造コストの面でさらに利点を有すると考えられる。

この*B. coagulans*による非滅菌環境のL-乳酸発酵について、Akao *et al.*⁹⁾は培養条件に関しても検討を行い、55°CでpH5.5の条件より培養温度が低い条件では*Lactobacillus*属の、pHの高い条件では*Clostridium*属の優占化が起こり、その結果L-乳酸発酵が破綻することを示した。しかし、これらの結果は、発酵の初期において*B. coagulans*が非常に少ないと予想される環境からの実験結果である。そこで、例えば*B. coagulans*を多く含むと考えられるL-乳酸発酵液を植種することで、L-乳酸発酵可能範囲が広がることも充分考えられる。

本研究では、L-乳酸発酵液を植種することで、植種効果によるL-乳酸発酵の実施できる範囲の拡大化検討を行うこととした。培養条件の範囲については、*B. coagulans*の糖化酵素誘導に対する至適条件⁷⁾である50°CでpH7.0,あるいは、乳酸生成に対する至適条件⁹⁾である52°CでpH6.5を基に、55°CでpH5.5の条件から低温化(45~55°C)および高pH化(pH5.5~6.5)方向に対して検討を試みた。

2. 実験方法

(1) 実験装置

乳酸発酵の反応器には有効容積1 Lのセパラブルフラスコを用いた。温度設定にはウォーターバス(アズワン, TM-1), pH制御にはpHコントローラー(日伸理化, NPH-660)を用いた。なお、本研究では乳酸発酵が目的であり、発酵の進捗に従い低下するpHに対処する目的で、pH設定は下限値ON/OFF制御にて行った。pH調整は、pHコントローラーから起動・停止操作を受けるローラーポンプ(東京理化機器, MP-1000, 以下中和剤供給ポンプ)により10 N NaOHを供給する方法を取った。また、中和剤供給ポン

プの起動・停止を、1秒ごとにデータロガー(キーエンス, NR-1000)に記録した。培養開始に先立ち、反応器はオートクレーブ(121°C, 20分)により滅菌した。培養器をセットした際は、反応器内を嫌気状態に保つため、反応器のヘッドスペース部を窒素ガスにて置換した。さらに、2つのガスパック(発生ガスの捕集用と窒素ガスを充填した発酵液引抜き時の容積補充用)を反応器に取り付けた。

(2) 基質

本研究では、Table 1に示す材料を破碎したスラリー状の模擬生ごみを実験に使用した。模擬生ごみは、使用時まで冷凍庫にて保存した。培養実験に際しては、攪拌の都合から、作成した模擬生ごみを蒸留水で2倍希釈し、滅菌操作を行わずに利用した。

(3) 植種材料

植種材料は、55°CでpH5.5の条件下で十分にL-乳酸発酵された模擬生ごみの発酵液とした。これは、高温L-乳酸発酵が非滅菌環境下で実施できることから、将来的には半連続式培養によるL-乳酸発酵の実施を念頭に置いているためである。なお、半連続式培養は、植種菌の維持や植種の実施を必要としないことから、維持管理上の利点と成り得る。

(4) 実験条件

実施した実験条件をTable 2に示す。L-乳酸発酵条件の拡大化を目的とした実験では、植種量を1 Lの反応器に対して400 mLとした。これは、半連続式培養を意図し、滞留時間2日の場合の引継ぎ発酵液量(500 mL)に近づける量として設定した。なお、Table 2には植種量400 mL以外の培養系についても記しているが、これらの結果は上記目的では使用しないものの、L-乳酸生成量の考察にて使用する。

(5) 分析方法

生ごみおよび発酵液を対象に分析を行った。分析項目は、乳酸を含む有機酸(島津製作所, HPLC有機酸分析システム, カラム; Shim-pack SCR-102H), D-L-乳酸(島津製作所, HPLC, カラム; SUMICHIRAL OA-5000, 移動相; 5% 2-propanol・1 mM CuSO₄, 流量; 0.8 mL/min, UV-VIS検出器 SPD-10Avp; 254 nm), 糖質(グルコース換算濃度; フェノールー硫酸法⁹⁾), COD-cr (Standard Methods, Colorimetric Method¹⁰⁾), タンパク質(アルブミン換算濃度; ローリー・フォーリン法¹¹⁾), 全窒素(ブラン・ルーベ, AA法¹²⁾)である。なお、溶解態成分は、0.45 µmフィルターにてろ過した試料を対象とした。

乳酸の光学純度は、D-L-乳酸の絶対量を求め、その存在

Table 1. Components of artificial garbage

class	% ^a	foodstuff	% ^a
vegetables	50	cabbages	10
		potatoes	10
		carrots	10
		radishes	10
		celery cabbages	10
fruits	20	apples	2.5
		coats of oranges	7.5
		coats of banana	10
grain	20	rice	10
		bread	2.5
		noodles	7.5
meat	2.5	ground meats	2.5
sea food	5	fishes	3.5
		fish bone	1.5
eggs	2.5	eggs	2.5

a: wet weight basis

Table 2. Operational conditions.

	TEST 1		TEST 2				TEST 3			TEST 4	
	RUN 1	RUN 2	RUN 3	RUN 4	RUN 5	RUN 6	RUN 7	RUN 8	RUN 9	RUN 10	RUN 11
temp. (°C)	50	55	45	50	50	50	55	50	55	55	55
pH (-)	5.5	6.5	6.0	5.5	6.0	6.5	6.0	5.5	6.0	5.5	5.5
IVCB (g)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
initial LA (g/L)	12.9	12.9	9.5	9.5	9.5	9.5	10.1	10.1	10.1	10.2	10.2

	TEST 5	TEST 6	TEST 7		TEST 8	TEST 9	TEST 10		
	RUN 12	RUN 13	RUN 14	RUN 15	RUN 16	RUN 17	RUN 18	RUN 19	RUN 20
temp. (°C)	55	55	55	55	55	55	55	60	60
pH (-)	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	6.0
IVCB (g)	400	200	0	0	0	0	0	0	0
initial LA (g/L)	11.8	7.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1

IVCB; inoculation volume of cultural broth, initial LA; initial Lactate concentration

量から次式により算出した。

$$\frac{(L\text{-乳酸}) - (D\text{-乳酸})}{(L\text{-乳酸}) + (D\text{-乳酸})} \times 100 \quad (1)$$

(6) 解析方法

a) L-乳酸生成可能量

L-乳酸生成可能量 (potential production of L-lactate; PPLLA) は、もともと生ごみにわずかに含まれる乳酸量は排除するもの、植種材料作成中に生成される乳酸量は加味した量とした。これは、植種材料がもともとは同じ模擬生ごみであり、さらに55°CでpH5.5の条件で培養された植種材料にも異なる培養条件次第では発酵余力があることから、生ごみまで立ち返り評価することが適切であると考えたためである。

b) 平均乳酸生成速度

本研究では、乳酸生成速度として、平均乳酸生成速度 (average production rate of lactate; APRLA) と推定乳酸生成速度 (estimated production rate of lactate; EPRLA) の2種類を定義し用いた。APRLAは、多糖の加水分解や乳酸生成など、

多段階と考えられる発酵過程を大きく時間により依存する速度 (0次反応) と捉えて算出したものである。算出方法は、各培養の終端において生成される乳酸量のうち、75%以上の生成を確認できる最初のサンプリング時点までに要した時間とその時の生成乳酸量から求めた速度とした (Fig. 1参照)。乳酸発酵の終端まで培養を行わなかった系 (Run 8, Run 10およびRun 11) については、最終サンプリング時点までに要した時間とその時の生成乳酸量から同速度を求めた。一方、EPRLAは、1秒ごとに行う中和剤供給ポンプの駆動 (ON/OFF) 記録より求められるサンプリングのタイミングに依存しない速度である¹³⁾。同速度は、瞬間的な乳酸生成速度のピーク時を含む中和剤供給ポンプが10回のON/OFFに要する時間 (概ね30~40分) あたりに供給した中和剤量を、中和の際の化学量論値を基に乳酸生成量に置き換えて求めた速度であり、容積あたりの最大速度を示す。速度算出法から見ると、最大速度を示すEPRLAは、1秒後ごとのデータから一定のルールを基に算出される点において一般性の面で優れていると考えられる。しかし、生ごみからL-乳酸を生成するような多段階反応を考慮する場合、瞬間的な速度よりも、長期間にわたる安定した速度を評価対象とするほうが適当である場合が多い。そこで、考察では平均乳酸生成速度を用いることとした。ただし、平均乳酸生成速度の一般性を評価するため、推定乳酸生成速度との比較を実施した。

c) 重回帰分析

重回帰分析は、目的変数と説明変数が線形関係であることを仮定し、式(2)により目的変数の予測値を求めるものである¹⁴⁾。

$$Y_{\text{rate/product}} = a_0 + a_1 x_{\text{temp}} + a_2 x_{\text{pH}} \quad (2)$$

$Y_{\text{rate/product}}$: 乳酸生成に関する目的変数の予測値

$x_{\text{temp}}, x_{\text{pH}}$: 温度, pHに関する説明変数

a_1, a_2 および a_0 : 回帰係数および定数

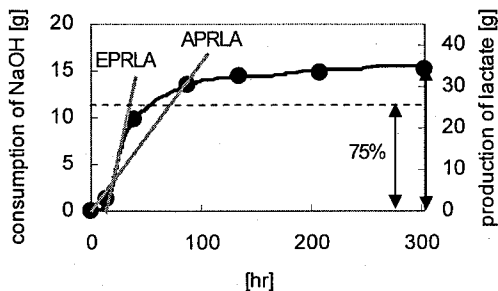


Fig. 1. Description of average production rate of lactate (APRLA) and estimated production rate of lactate (EPRLA) (line; recording of NaOH consumption, ●; observed lactate production).

Table 3. Characteristics of artificial garbage.

	Total	Soluble
TS (g/L)	192	-
SS (g/L)	81.0	-
VTS (%)	96.3	-
COD-cr (g-COD/L)	209	111
T-N (g/L)	3.95	0.95
Carbohydrate (g-glucose/L)	119	95.6
Protein (g-albumin/L)	24.3	4.4
Organic acids (g-COD/L) ^a	-	1.2
lactic acid (g-COD/L) ^a	-	0.5
pH (-)	5.2	-

a; COD basis

Table 4. Operational conditions of seed culture.

TEST	1	2	3	4	5	6
temp. (°C)	55	55	55	55	55	55
pH (-)	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
CT (hr)	234	161	95	231	166	161
LA conc. (g/L)	31.9	23.2	24.8	25.2	29.0	35.2
CH conc. (g/L)	25.9	34.0	34.8	36.1	29.5	25.5

CT; cultivation time, LA; lactate, CH; carbohydrate

説明変数は、実験操作幅を基準化することで、説明変数間の影響の大きさを評価できるものとした。温度は、55°Cを0とし、+5°C刻みを変量1とした。pHは、5.5を0とし、+0.5刻みを変量1とした。また、式(2)は、決定係数 R^2 （重回帰係数 R ）以外に、重回帰式の検定を行うことで、説明変数により目的変数が説明できるかどうかを検討した。これは、回帰による変動と残差の変動の不偏分散の比（分散比） F_0 が自由度（ $p, n-p-1$ ）の F -分布に従うことを利用したものである。ただし、 p ; 説明変数の数、 n ; 解析に用いた実験回数である。危険率0.05の場合において、 $F_0 > F(p, n-p-1, 0.05)$ となる場合、説明変数により目的変数が説明できると判断した。

3. 結果および考察

(1) L-乳酸発酵の実施可能条件

各回分式培養に使用した模擬生ごみの性状および植種材料の性状を各々Table 3, 4に示す。

Table 2の各TESTのうち、培養経過に伴う乳酸濃度およびL-乳酸の光学純度の変化の例をFig. 2, 3に示す。また、既往研究⁹⁾も含めて実施した全ての実験条件でのL-乳酸の発酵状況を、まとめてFig. 4に示す。これらによると、植種を伴わない回分式培養では55°Cより高温条件および55°CでpH5.5の条件がL-乳酸発酵の条件であったが、植種によりその条件の範囲が拡大したことが分かる。また、Fig. 4

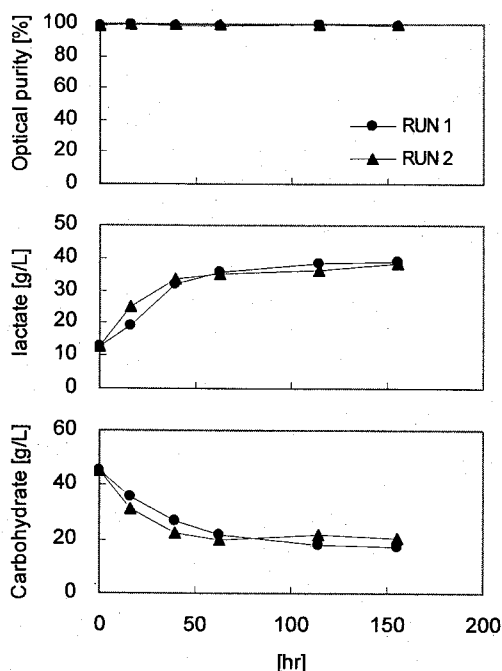


Fig. 2. Time courses of optical purity of lactate, lactate conc. and carbohydrate conc. in TEST 1.

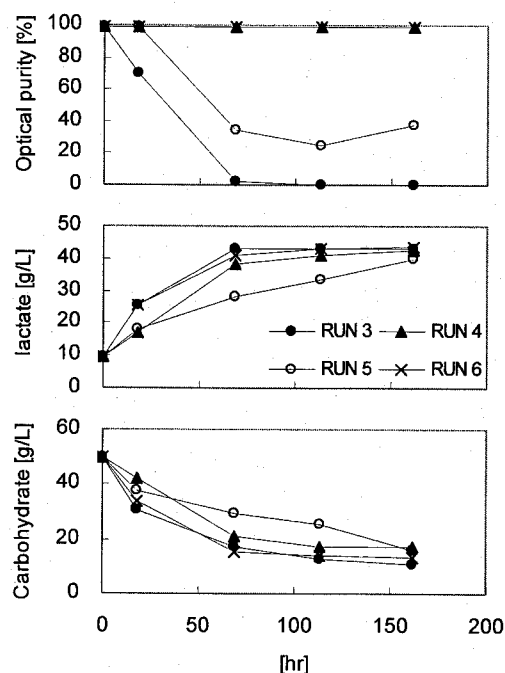


Fig. 3. Time courses of optical purity of lactate, lactate conc. and carbohydrate conc. in TEST 2.

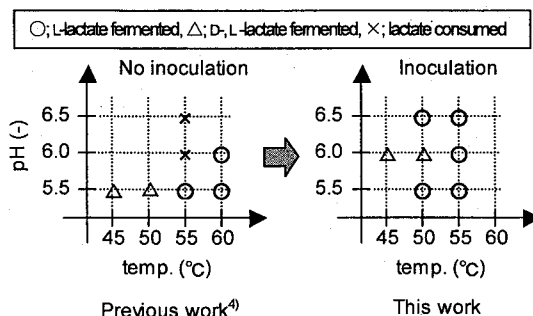


Fig. 4. Comparison between with and without inoculation for L-lactate fermentation in batch culture.

によると、植種を伴う条件の50°Cでの培養においてpH6.0のみがL-乳酸発酵に至っていない。一般的な嫌気性微生物の性質を考慮すると、55°CでpH5.5から培養条件が低温化および高pH化するに伴い、生育環境的に増殖が有利となる競合菌種が増加すると考えられる。そのため、50°CでpH6.0の条件も競合菌の増殖を招きL-乳酸発酵に至らなかったものと考えられる。しかし、50°CでpH6.5の条件ではL-乳酸発酵に至った。これは、培養条件が、*B. coagulans*の多糖加水分解酵素の誘導（50°CでpH7.0）や乳酸生成（50°CでpH6.5）に対する至適条件に非常に近づいたものであったため、培養開始時に優占化された利点を生かし、競合菌の増殖を凌ぐ*B. coagulans*の増殖が起こったものと考えられる。

Fig. 3に示したようにL-乳酸発酵に至らなかった、45°CでpH6.0 (Run 3) および50°CでpH6.0 (Run 5) の条件では、乳酸以外の有機酸の生成やガス発生は起こらなかった。

消費された糖質量もL-乳酸発酵に至った系列と同程度であったことから、これら条件では、ホモ乳酸菌のため乳酸収率の高い*B. coagulans*⁸⁾と同程度の収率でD-乳酸を含む乳酸を生成できる乳酸菌が優占化したものと判断される。一方、既往研究⁹⁾と異なり、pHが6.0と緩和された条件にも拘わらず*Clostridium*属などの有機酸およびガス生成を行う菌種が優占化しなかった理由は、植種として持ち込まれた乳酸塩の抗菌効果によるものと推察している¹⁹⁾。

各回分式培養の結果をまとめたものをTable 5に示す。これによると、温度の低下およびpH上昇に対してL-乳酸生成可能性が増加している傾向が見られる。そこで、植種を行った系列の平均乳酸生成速度および培養時間が十分に長い (Table 5中の培養時間161 hr以上) 系列のL-乳酸生成可能性を、温度およびpHに対してプロットした図をFig. 5に示す。これによると、温度低下およびpH上昇に伴い、平均乳酸生成速度およびL-乳酸生成可能性が増加している傾向が確認された。

(2) 平均乳酸生成速度

平均乳酸生成速度は、発酵の進捗を表す速度と考えているが、2. (6)で記した通りサンプリングのタイミングにある程度依存する速度である。一方、推定乳酸速度は、一定のルールを基に各培養間において同条件で求まる速度である。そこで、両速度を比較することで平均乳酸生成速度の一般性の確認を行った。Fig. 6に結果を示す。これによると、1点 (Run 16) を除いて両速度は概ね相関関係を有することが分かる。換言すると、サンプリングのタイミングに依存するものの長期間にわたる平均的な速度を示

Table 5. Summaries of performance of each fermentation.

	TEST 1		TEST 2				TEST 3			TEST 4	
	RUN 1	RUN 2	RUN 3	RUN 4	RUN 5	RUN 6	RUN 7	RUN 8	RUN 9	RUN 10	RUN 11
CT (hr)	155	155	162	162	162	162	161	65	161	95	95
LA conc. (g/L)	38.7	38.2	43.0	42.5	40.0	43.4	35.3	29.2	33.3	22.5	27.1
OP (%)	99.4	99.7	0.5	99.2	37.4	99.3	99.1	99.3	98.9	99.0	99.4
APRLA (g/L/hr)	0.37	0.52	- ^a	0.42	- ^a	0.46	0.31	0.30	0.14	0.13	0.18
ET (hr)	63	40	- ^a	68	- ^a	68	65	65	161	95	95
EPRLA (g/L/hr)	1.45	2.05	- ^a	2.37	- ^a	2.00	1.26	0.98	0.46	- ^b	- ^b
PPLLA (g/L)	38.3	37.9	- ^a	42.1	- ^a	43.0	34.9	- ^b	32.9	- ^b	- ^b

	TEST 5	TEST 6	TEST 7		TEST 8	TEST 9	TEST 10		
	RUN 12	RUN 13	RUN 14	RUN 15	RUN 16	RUN 17	RUN 18	RUN 19	RUN 20
CT (hr)	161	180	234	234	307	305	303	303	303
LA conc. (g/L)	35.2	33.8	32.3	31.6	29.5	34.9	34.3	29.3	31.5
OP (%)	99.0	99.4	99.4	99.1	98.9	99.5	99.2	99.2	99.2
APRLA (g/L/hr)	0.32	0.28	0.28	- ^b	0.10	0.13	0.35	0.14	0.19
ET (hr)	67	86	103	- ^b	307	233	87	208	134
EPRLA (g/L/hr)	- ^b	1.42	1.28	- ^b	3.54	- ^b	1.50	0.95	1.44
PPLLA (g/L)	34.8	33.6	31.9	31.2	29.1	34.6	34.0	29.0	31.2

CT; cultivation time, LA; lactate, OP; optical purity, APRLA; average production rate of lactate, ET; evaluation tin EPRLA; estimated production rate of lactate, PPLLA; potential production of L-lactate
a; not L-lactate fermentation, b; lack of data or not estimable data

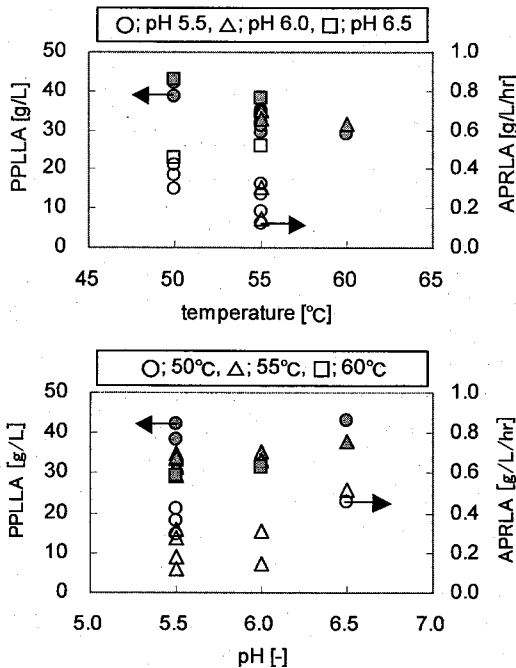


Fig. 5. Distributions of potential production of L-lactate (PPLA) and average production rate of lactate (APRLA) on temp. and pH conditions in batch culture.

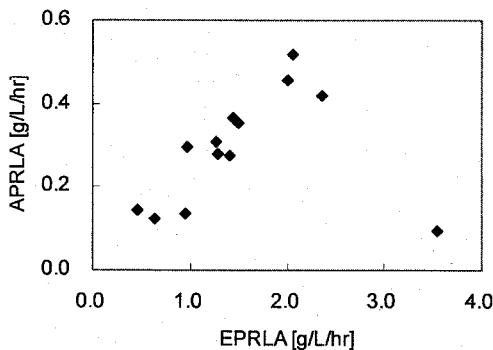


Fig. 6. A scatter plots of estimated production rate of lactate (EPRLA) vs. average production rate of lactate (APRLA) in batch culture.

している平均乳酸生成速度は、各培養間において同条件で求まる容積あたりの瞬間的な最大速度を示す推定乳酸速度と相関を有することから、平均乳酸生成速度は一般性を有する速度と考えることができる。なお、他と異なる関係を示したRun 16の点は、階段状に多段階で発酵が進行した培養系であり、瞬間的に速い速度を記録したものの平均乳酸生成速度を算出する際に長期間の培養時間を要したことから察せられるとおり (Table 5参照)、発酵そのものは緩やかに進行したものである。したがって、

Table 6. Analysis of variance for the linear model for average production rate of lactate.

Sources	SS	df	MS	F	P
Model	0.084	2	0.042	4.004	0.069
Error	0.073	7	0.010		
Corrected total	0.157				
Root MSE = 0.102; $R^2 = 0.534$; $R = 0.730$					

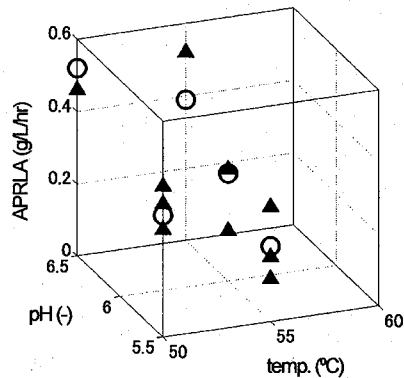


Fig. 7. Comparison between predicted and observed average production rate of lactate (APRLA) on temperature and pH conditions (○; predicted value, ▲; observed value).

Run 16の発酵を反映する速度としては平均乳酸生成速度が適当と考えられる。以上から、ここでは平均乳酸生成速度が発酵の進行を表す速度であると考え、後述する考察に用いた。なお、今後は、推定乳酸生成速度を求めたデータより平均的な乳酸発酵速度を求める工夫も必要と考える。

次に、温度およびpHを説明変数とし、平均乳酸生成速度を予測する重回帰分析を実施した。これは、温度低下およびpH上昇に対し、平均乳酸生成速度が上昇する傾向が見られたことに基づく。用いたデータは、Table 5中の植種量400 mLとしたRun 1～Run 12のうち、L-乳酸発酵に至らなかったRun 3とRun 5を除いた結果 (10点) である。植種量400 mLの培養系の結果のみを用いた理由は、平均的な速度のため影響は小さいと考えられるものの、初期菌量や基質量の条件をなるべく揃えるためである。得られた結果を式(3)およびTable 6に示す。

$$Y_{\text{Lac}} = 0.297 - 0.133 \cdot x_{\text{temp}} + 0.089 \cdot x_{\text{pH}} \quad (3)$$

ただし、植種を伴うL-乳酸発酵を確認した範囲 (50～55°C, pH5.0～6.5) において有効とする。また、D-乳酸となった50°CでpH6.0の条件は除くものとする。

重回帰式の検定結果より、式(3)の結果は、危険率0.05において説明変数による平均乳酸生成速度の予測は困難とされた。ただし、危険率0.07においては有効であることか

ら、温度あるいはpH条件の変化に対して、平均乳酸生成速度が受ける傾向については言及できると考えられる。Fig. 7に、式(3)による予測値と実測値を示す。なお、図中では、回分式培養によりL-乳酸発酵が行えた条件のみ予測値と実測値を示している。Fig. 7より、温度低下およびpH上昇に伴い平均乳酸生成速度が増加すること、式(3)の回帰係数より、温度変化（変化単位:5℃）がpH変化（変化単位:0.5）より平均乳酸生成速度に対して大きな影響を与えることが推測された。

(3) L-乳酸生成可能量

平均乳酸生成速度と同様の重回帰分析をL-乳酸生成可能量についても実施した。ただし、同量に関しては、L-乳酸発酵が進展する条件下において長時間の培養を実施すれば、植種の有無に拘わらず培養条件に応じた所定のL-乳酸量が得られると経験より考えられる。そこで、Table 5に示したPPLA（15点）を解析に使用した。得られた結果を式(4)およびTable 7に示す。

$$Y_{PPLA} = 35.29 - 5.58 \cdot x_{temp} + 2.06 \cdot x_{pH} \quad (4)$$

ただし、回分式培養によりL-乳酸発酵を確認した範囲（50～55℃、pH5.0～6.5）において有効とする。また、D-L-乳酸となった50℃でpH6.0の条件は除くものとする。

重回帰式の検定結果より、式(4)は、危険率0.05において説明変数によりL-乳酸生成可能量を予測できることが示された。式(4)による予測値と実測値をFig. 8に示す。これによると、*B. coagulans*の増殖至適域である50℃でpH6.5付近に接近するにつれて、L-乳酸生成可能量が高まっていることが示された。また、式(4)の回帰係数より、平均乳酸生成速度と同様に、温度変化（変化単位:5℃）がpH変化（変化単位:0.5）よりL-乳酸生成可能量に対して大きな影響を与えることも示された。さらに、式(3)と式(4)の回帰係数の比を取ると、式(4)（ $5.58/2.06 = 2.71$ ）は式(3)（ $0.133/0.089 = 1.49$ ）以上に温度の変量に対する影響を受けることが分かった。

以上の結果から、今後高温L-乳酸発酵の半連続式培養を実施する場合は、L-乳酸の収率向上を目的に、温度条件を重視する培養条件を選択することが望ましいと考えられる。

4. 結論

本研究は、回分式培養において、模擬生ごみを原料に十分にL-乳酸発酵を実施した発酵液を植種として利用することにより、非滅菌高温L-乳酸発酵が実施可能となる温度およびpHに関する培養条件の検討を行った。また、得ら

Table 7. Analysis of variance for the linear model for potential production of L-lactate.

Sources	SS	df	MS	F	P
Model	198.8	2	99.39	24.44	0.000
Error	48.80	12	4.067		
Corrected total	247.6				
Root MSE = 2.017; $R^2 = 0.8029$; $R = 0.8960$					

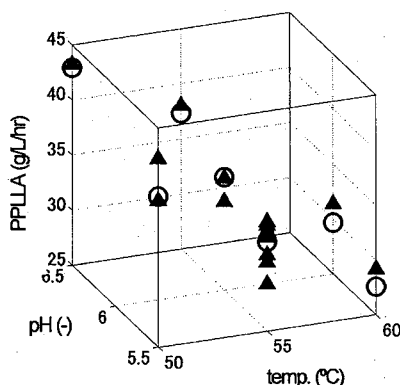


Fig. 8. Comparison between predicted and observed potential production of L-lactate (PPLA) on temperature and pH conditions (○; predicted value, ▲; observed value).

れた実験結果に対し、温度およびpHを説明変数とした重回帰分析を行うことで、効率的な高温L-乳酸発酵条件への方向性を示した。ここで得られた主な成果を以下にまとめる。

- (1) 植種を伴うことで、50℃でpH5.5、50℃でpH6.5、55℃でpH6.0および55℃でpH6.5の条件においてL-乳酸発酵が行え、温度およびpHに関するL-乳酸発酵条件の拡大化が示された。
- (2) L-乳酸発酵に至らなかった条件（45℃でpH6.0、50℃でpH6.0）では、その生成物からD-乳酸を生成できる乳酸菌が優占菌となったと考えられる。一方、緩和されたpH条件にも拘わらず乳酸を消費する菌種が優占とならなかった原因は、抗菌効果を有する乳酸が発酵液の植種に伴い培養初期に高い濃度で存在したためと推察される。
- (3) 平均乳酸生成速度およびL-乳酸生成可能量を目的変数に重回帰分析を行なった結果、低温化および高pH化によりL-乳酸発酵の効率化が説明された。これは、*B. coagulans*の糖化酵素誘導に対する至適条件や乳酸生成に対する至適条件に接近することで、発酵が効率化することを示したものであると推察される。

以上より、高温L-乳酸発酵法を今後半連続式培養へ展開する際は、培養条件として、50℃でpH6.5、あるいは50℃

でpH5.5を検討することが適当であると考えられる。

参考文献

- 1) 酒井謙二, 白井義人: ポリ乳酸生産を基軸とした都市生ごみのトータルリサイクルシステム, 廃棄物学会誌, Vol. 15, pp. 89-96, 2004.
- 2) Vink, E.T.H., Rabago, K.R., Glassner, D.A. and Gruber, P.R.: Applications of life cycle assessment to NatureWorks (TM) polylactide (PLA) production, Poly. Degrad. Stab., Vol. 80, No. 3, pp. 403-419, 2003.
- 3) 園元謙二, 石崎文彬: 乳酸発酵, 発酵ハンドブック, バイオインダストリー協会発酵と代謝研究会 (編著), pp. 316-319, 共立出版, 2001.
- 4) Sakai, K., Murata, Y., Yamazumi, H., Tau, Y., Mori, M., Moriguchi, M., and Shirai, Y.: Selective proliferation of lactic acid bacteria and accumulation of lactic acid during open fermentation of kitchen refuse with intermittent pH adjustment, Food. Sci. Technol. Res., Vol. 6, No. 2, pp. 140-145, 2000.
- 5) Taniguchi, M., Hoshina, M., Tanabe, S., Higuchi, Y., Sakai, K., Ohtsubo, S., Hoshino, K. and Tanaka, T.: Production of L-lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation using unsterilized defatted rice bran as a carbon source and nutrient components, Food. Sci. Technol. Res., Vol. 11, No. 4, pp. 400-406, 2005.
- 6) Akao, S., Tsuno, H., Horie, T. and Mori, S.: Effects of pH and temperature on products and bacterial community in L-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition, Manuscript submitted for publication.
- 7) Babu, K.R. and Satyanarayana, T.: Parametric optimization of extracellular α -amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans*, Folia Microbiol., Vol. 38, No. 1, pp. 77-80, 1993.
- 8) Payot, T., Chemaly, Z. and Fick, M.: Lactic acid production by *Bacillus coagulans* Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations, Enzyme Microb. Technol., Vol. 24, pp. 191-199, 1999.
- 9) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, J.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 3, pp. 350-356, 1956.
- 10) American Public Health Association/ American Water Studies Association/ Water Environment Federation: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th edn., pp. 5.13-5.18, 1995.
- 11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., Vol. 193, No. 1, pp. 265-275, 1951.
- 12) 日本下水道協会: 下水試験方法 上巻, pp. 188-189, 1997.
- 13) 赤尾聡史, 津野洋, 堀江匠: 生ごみ L-乳酸発酵条件の半連続式培養への拡張と適用, 投稿中.
- 14) 有馬哲, 石村貞夫: 多変量解析のはなし, pp. 37-61, 東京図書, 1987.
- 15) 松田敏生: 食品微生物制御の化学, pp. 104-132, 幸書房, 1999.

(2006.5.26受付)

Effects of pH and temperature on unsterile thermophilic fermentation with L-lactate cultured broth inoculum

Satoshi AKAO¹, Hiroshi TSUNO¹ and Taku HORIE¹

¹Dept. of Environ. and Urban Eng. Grad. School of ENG., Kankyo University

In order to expand cultivation conditions of pH and temperature, a series of thermophilic L-lactate batch fermentation experiments of unsterilized garbage was investigated with fermented L-lactate cultural broth inoculum in consideration of semi-continuous operation. The results showed that L-lactate was produced under the set of conditions of pH 6.5 and 50°C with using the inoculation. On the other hand, D-, L-lactate was fermented under the set of conditions of pH 6.0 and 50°C. These conflicting respects would depend on the optimal growth conditions of *Bacillus coagulans* that is the L-lactic acid bacterium of the thermophilic L-lactate fermentation. The optimal growth condition of *B. coagulans* was reported at pH 6.5~7.0 and around 50°C. A multiple regression analysis was applied to production of L-lactate on each L-lactate batch fermentation for evaluating effects of pH and temperature. This analysis indicated that decrease in temperature to 50°C and increase in pH to 6.5 would enhance its production in thermophilic L-lactate batch fermentation.